

08.10.99

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4801

REC'D 22 OCT 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 9月 3日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第249752号

出 願 人  
Applicant (s):

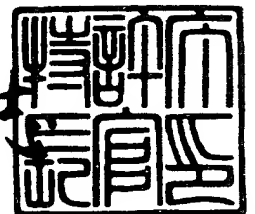
旭化成工業株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山 佐 建 彦



出証番号 出証特平11-3058995

【書類名】 特許願

【整理番号】 X10-00844

【提出日】 平成10年 9月 3日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12  
C07K 14/705

【発明の名称】 新規受容体蛋白質 C 5 L 2

【請求項の数】 12

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

    【氏名】 大野 満春

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都千代田区有楽町 1 丁目 1 番 2 号 旭化成工業株式会社内

    【氏名】 石丸 弘

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都港区白金台 4 - 5 - 7 - 4 0 1

    【氏名】 高橋 恒夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000000033

    【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

    【代表者】 山本 一元

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 011187

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 受託証 1

特平 10-249752

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規受容体蛋白質 C5L2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 またはその塩。

【請求項 2】 請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 3】 請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 をコードする塩基配列を含有する核酸。

【請求項 4】 配列表配列番号 2 で表される塩基配列を有する請求項 3 記載の核酸。

【請求項 5】 配列表配列番号 3 で表される塩基配列のうち少なくとも一部の塩基配列を有する 12mer から 16mer 以上、さらに望ましくは 20mer 以上の核酸、及びその誘導体。

【請求項 6】 配列表配列番号 4 で表される塩基配列のうち少なくとも一部の塩基配列を有する 12mer から 16mer 以上、さらに望ましくは 20mer 以上の核酸、及びその誘導体。

【請求項 7】 請求項 3 または 4 記載の核酸を含有するベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載のベクターを保持する 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 発現形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜に 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 を生成せしめることを特徴とする 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 またはその塩の製造方法。

【請求項 10】 請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 に対するリガンドの決定方法。

【請求項 11】 (i) 請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンド

を接触させた場合と (ii) 請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行うことを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 記載の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 もしくはその塩または請求項 2 記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、未成熟樹状細胞に発現する新規な 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2, それを構成している部分ペプチドまたはこれらの塩に関する。また、本発明は、前記 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2, それを構成している部分ペプチドをコードする核酸あるいはその誘導体に関する。

【0002】

さらに、本発明は、この核酸を用いて遺伝子操作により 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 を発現させる 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の製造方法、及びそれに使用される発現ベクター及び形質転換体に関する。

また、さらに本発明は、7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 を用いて、この蛋白質に対するリガンドを決定する方法、この蛋白質との結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法あるいはこの蛋白質に対する抗体に関する。

本発明では、7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 を用いて樹状細胞の機能を制御する医薬品を開発することができる。

【0003】

【従来の技術】

樹状細胞は、生体内において免疫・炎症に関わる機能を司る。特に、感染の際には、種々の有益な免疫・炎症反応のメカニズムによって、生体を防御する。しかし、その一方で自己免疫など望ましくない免疫・炎症作用をも引き起こす。従って、樹状細胞の機能を制御する方法を得ることによって、有益な免疫応答を引

き起こし、感染や腫瘍の治癒をもたらしたり、あるいは有害な免疫応答を減退させることにより、自己免疫性疾患などを治療したりすることが可能になると予想される。

【0004】

マクロファージ及び樹状細胞は、代表的な抗原提示細胞として知られる。マクロファージは活性化されたT細胞及びB細胞に対して提示を行う (Sornasse et al., J. Exp. Med. 175:15-21, 1992年)。しかしながらヘルパーT細胞の活性化は、樹状細胞による抗原提示に依存する。樹状細胞は、末梢血液中の抗原をとらえ、リンパに移動し、最終的にリンパ節で成熟すると考えられている。マクロファージ及び樹状細胞は、全ての成熟段階において、既に活性化されているT細胞に抗原を提示することができる。成熟樹状細胞だけは、ナイーブT細胞に感作することができることが報告される。(Mehta-Damani et al., J. Immunology 153:996, 1994年)。

【0005】

生体内において樹状細胞は骨髄の造血幹細胞から誘導される。樹状細胞の前駆体及び未成熟の樹状細胞は、血液及びリンパ液中に存在し、完全に成熟した樹状細胞は脾臓及びリンパ節に存在する。抗原提示において役割を果たす際に樹状細胞はMHCクラスIタンパク質及びクラスIIタンパク質を高発現する。

近年樹状細胞は、大量にインビトロで調製することが可能となった (Romani et al., J. Exp. Med. 180:83-93, 1994年)。骨髄由来もしくは臍帯血由来の未分化なCD34陽性細胞、もしくは末梢血単球からGM-CSF、IL-4、TNFにより分化誘導することが知られる。

【0006】

また、培養時に添加するサイトカインの組み合わせにより、未成熟樹状細胞、成熟樹状細胞への誘導が可能となる (Talmor M, ら, Eur. J. Immunol. 28, 811-817, 1998年; Morse MA ら, Ann Surg, 226, 6-16, 1997年)。一般に未成熟樹状細胞は、抗原の取り込み量が高いとされ、成熟するに従って、抗原の提示能が上昇してくる。

免疫の抑制においては、抗原提示能の低い段階の未成熟樹状細胞を抑制することが望ましい。

【0007】

樹状細胞の機能、すなわちその増殖、分化、活性化、化学遊走等は樹状細胞に発現している様々な受容体蛋白質によって制御されている。受容体とは、細胞表面に存在し、他の細胞の表面や体液中に存在するシグナル分子と高い親和性で結合し、そしてその結合という細胞外の出来事を細胞内シグナルに変換して細胞の応答を引き起こすものである（中村桂子・松原健一監修、細胞の分子生物学（第2版）、教育社、936、1990年）。

【0008】

従って、これらの受容体の機能を変化させるもの、すなわちその受容体と結合して刺激するものや、受容体と結合して刺激を遮るもの、その刺激が細胞内に伝達されることを阻害するものを得ることができれば、樹状細胞の機能を正や負に制御し、さらには、樹状細胞の機能の不足や過剰に起因する疾患の治療に役立つ物質を得られることが予想される。

【0009】

例えば白血球の受容体としては、サイトカイン受容体ファミリー、EGF（Epidermal Growth Factor）受容体ファミリー、7回膜貫通型受容体ファミリーなど種々の受容体蛋白質が知られており（The Leucocyte Antigen Facts Book, アカデミックプレス、38-49、1993年）、その機能は多岐にわたっている。7回膜貫通型受容体蛋白質ファミリーは、このような受容体ファミリーの一つであり、G蛋白質共役型受容体（G-protein coupled receptor）、ロドプシン型受容体などとも呼ばれる。白血球においては、7回膜貫通型受容体蛋白質の研究は比較的新しく開始されており、いまだ数多くの未知の7回膜貫通型受容体蛋白質が存在すると考えられている。

【0010】

現在までに白血球に存在する7回膜貫通型受容体蛋白質として同定されたものとしては、アナフィラトキシンと結合する受容体群、ケモカインと結合する受容

体群、PAF（血小板活性化因子）と結合する受容体などがある。

例えば、アナフィラトキシンの受容体は、好中球やマクロファージの機能、例えば、活性酸素の産生、化学遊走、細胞接着の活性化に関与している（Bouley, F. ら、*Biochemistry* 30, 2993-2999, 1991年）。ケモカインと結合する受容体群の一つ、マウスのIL-8（インターロイキン8）受容体ホモログの欠損マウスでは、炎症誘導物質の腹腔内投与による好中球浸潤が減少したと同時に好中球増加症、骨髓やリンパ節での顆粒球、形質細胞の増加が観察された（飯笹久、松島綱治、*臨床免疫*、28, 731-737, 1996年）。従って、これらの7回膜貫通型受容体蛋白質は、白血球の増殖、分化、活性化、化学遊走等を制御している。

#### 【0011】

これらの受容体に作用する化合物のうち、疾患の治療剤として可能性があると考えられているものの中には、IL-8, MCP-1（Monocyte Chemoattractic Protein 1）の様に受容体に結合して刺激するものや、IL-8変異体の様に受容体と結合して刺激を遮るものがある（Howard, O. M. Z. ら、*TIBTECH*, 14, 46-51, 1996年）。

#### 【0012】

7回膜貫通型受容体においては、多くの場合、受容体とシグナル分子の関係は1対1対に対応しているのではない。従って、疾患の治療を考えた場合にはシグナル分子を知ることだけでは不十分である。例えば、セロトニンの場合には、セロトニンという単一のシグナル分子に対し、イオンチャンネル型受容体という全く異なるシグナル伝達経路の受容体を含む14種の受容体が知られており、さらに、個々の受容体に特異的に結合する化合物も知られており（1996 *Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement*, *Trends Pharmacol. Sci.*、1996年）、それぞれ異なる疾患の治療への応用も考えられている。また、ケモカイン群の場合には、単一のシグナル分子が多数の受容体と反応すると同時に、単一の受容体が多数のシグナル分子と反応する例も多く知られている（C. A. Power ら、*Trends Pharmacol. Sci.* 17, 209-213, 1996年）。



6年)。

【0013】

従って、仮に単一のシグナル分子が疾患の原因であるとしても、細胞の種類によって異なる受容体がある場合には複数が存在し、疾患の原因である特定の細胞群の機能を特異的に制御する場合には、その細胞に作用するシグナル分子の特定よりもその細胞に発現している受容体を特定することが重要となる。例えば、白血球に作用するシグナル分子群ケモカイン群の場合、シグナル分子RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) に対しては種々の白血球が反応するが、好酸球にはケモカイン受容体の一つCCR3が特異的に発現しており、好酸球を特異的に制御する方法を検索する際には受容体CCR3が必要となる(Howard, O. M. Z. ら、TIBTECH, 14, 46-51, 1996年)。

【0014】

また、ヒトとその他の生物種の受容体では同一の化合物に対する反応が異なることも知られており(例えば、Marleau S. ら、J. Immunol. 157, 4141-4146 (1996))、ヒトの受容体に対して活性化の作用をもつものが他の生物種の受容体に対し、活性化を阻害するものとして働く例も知られている。従って、ヒトに対する医薬品を開発するためには、ヒト由来の受容体を得ることが必要である。

【0015】

さらに、これらの受容体の中にはウイルスの感染の際の受容体として働くものがあることが知られており(例えば、Choe H. ら、Cell 85, 1135-1148, 1996年)、これらの受容体に結合する分子がウイルスの感染を防ぐことも知られている(例えば、Bleul C. C. ら、Nature, 382, 829-833, 1996年)。こういった場合にも、ウイルスの感染する細胞に発現する受容体を知ることが肝要となる。また、これらの場合にも、特定のウイルスが感染するためには、特定の種の受容体が必要であることが知られている。従って、この場合にもヒトに対する医薬品を開発するためには、ヒ

ト由来の受容体を得ることが必要である。

【0016】

現在に至るまで、白血球に作用するシグナル分子のうち、例えば既知のケモカインのうちPF4, HCC1などの受容体については7回膜貫通型受容体蛋白質であると推定されているものの、受容体タンパク質は同定されていない(Premack B. A. ら、Nature Medicine 2, 1174-1178, 1996年; Loetscher M. ら、J. Exp. Med. 84, 963-969, 1996年)。特にケモカイン群については、さらに多くの新規ケモカインが存在すると推定されており(Howard, O. M. Z. ら、TIBTECH, 14, 46-51, 1996年)、さらに未知のケモカインに対する多くの受容体が存在することが期待される。以上の様に、白血球に作用する分子の受容体はすべて理解されたわけではなく、白血球にはさらに多くの7回膜貫通型受容体蛋白質が存在し、かつ、それらの受容体の作用を変化させるものを得ることによって、白血球の機能を制御し、ひいては、疾患を制御する方法が得られると期待される。

【0017】

樹状細胞についても同様であり、樹状細胞に作用する分子の受容体はすべて理解されたわけではなく、樹状細胞には多くの7回膜貫通型受容体蛋白質が存在すると考えられ、成熟した樹状細胞からGPCRとしてSchemR23が報告されている(Samson, M. ら、Eur. J. Immunol. 28, 1689-100, 1998年)。樹状細胞の異なる分化段階において発現する受容体を取得し、かつ、それらの受容体の作用を変化させるものを得ることができれば、樹状細胞の機能を制御し、ひいては、疾患を制御する方法が得られると期待される。

【0018】

7回膜貫通型受容体蛋白質に作用する内因性の物質は様々な受容体に対し様々な物質が知られている。例えば、生理アミンであるグルタミン酸、ドーパミンはそれぞれグルタミン酸受容体群、ドーパミン受容体群に結合する。また、ペプチドである神経ペプチドY, エンドセリンはそれぞれ神経ペプチドY受容体群、エ

ンドセリン受容体群に結合する (Watson, S. および Steve Arkinstall 著、The G-protein linked receptor Facts Book, Academic Press Inc.、1994年)。これらの中には、ケモカイン群、PAFの様に白血球に作用することが知られているものとそうでないものがある。

【0019】

これらの7回膜貫通型受容体蛋白質を活性化する物質は、天然・非天然を問わず、その物質と7回膜貫通型受容体蛋白質、受容体を発現している細胞の3者に依存して様々な細胞内シグナル分子の変動を引き起こす。そのシグナル分子の変動は、例えば細胞内cAMP濃度の上昇・下降、イノシトールリン酸濃度の上昇、細胞内カルシウム濃度の上昇、といった反応があり (Watson, S. および Steve Arkinstall 著、The G-protein linked receptor Facts Book, Academic Press Inc.、1994年)、そのそれぞれを測定する方法も開発されている。従って、これらの反応を測定することにより、特定の物質が特定の7回膜貫通型受容体蛋白質を活性化するかどうかあるいはその活性化を妨げるかどうかを判断することができる。このような物質が7回膜貫通型受容体蛋白質と結合して生じる、増殖・遺伝子発現の変動・化学遊走などの生理学的な現象を観察する方法も知られており、同じく、特定の物質が特定の7回膜貫通型受容体蛋白質を活性化するかどうかあるいはその活性化を妨げるかどうかを判断することができる。

【0020】

この様に7回膜貫通型受容体蛋白質に作用する物質の同定方法としては種々の方法が知られており、これらの方法を利用するためには、7回膜貫通型受容体蛋白質を同定すること、特にヒトの医薬品として有用な物質を得るためにはヒト由来の7回膜貫通型受容体を取得することが肝要である。

こういった考察に基づくと、各種成熟段階の樹状細胞の機能を制御し、疾患の制御を行うためには、これまで知られていない7回膜貫通型受容体を取得すること、特にヒトの医薬品として有用な物質を得るためにはヒト由来の7回膜貫通型受容体を取得することが大きな課題である。

## 【0021】

## 【発明が解決しようとする課題】

上記の様に、樹状細胞の機能を制御し、疾患をコントロールする手法はいまだ完成されていない。その最大の原因は、疾患に関連した樹状細胞の機能を制御している受容体蛋白質、特に7回膜貫通型受容体蛋白質が同定されていない点にある。本発明の課題は、新規な7回膜貫通型受容体蛋白質、またその蛋白質をコードするcDNA、その蛋白質の発現系、この蛋白質の応用、さらにその蛋白質の抗体を提供することにある。

## 【0022】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、未成熟樹状細胞に新規7回膜貫通型受容体が存在することを予想し、これらが樹状細胞の機能を制御する医薬品の探索に役立つと考えた。そこで実際に未成熟樹状細胞に発現している新規な7回膜貫通型受容体蛋白質cDNAを取得するために、Differential Display法（例えば、Liang, P. ら、Curr. Biol. 7, 274-280, 1995年）、RDA法（Lisitsyn, N. ら、Science 259, 946-951, 1993年）、degenerative PCR法（Innis M. A. ら、PCR Protocols, pp39-53, 1990年）など種々の方法を、種々のヒト組織、白血球、白血病細胞株などを材料に検討した。特にdegenerative PCR法については、実施例1に示すプライマーを一例とする20種以上のプライマーを試験した。このような鋭意努力の結果、樹状細胞より、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のcDNA断片を取得した。その後、そのcDNAコード領域全長を取得し、それがコードする新規蛋白質の発現系を作成し、さらにその抗体を作成することにより、本発明を完成した。

## 【0023】

本発明は、配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列を含有する7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2に関する。すなわち、本発明は、配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する7回膜貫通型受容体蛋

白質 C5L2 またはその塩に関する。また、該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の部分ペプチドまたはその塩に関する。また、該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 をコードする塩基配列を含有する核酸に関する。また、配列表配列番号 2 で表される塩基配列を有する上記核酸に関する。配列表配列番号 3 で表される塩基配列のうち少なくとも一部の塩基配列を有する 12mer から 16mer 以上、さらに望ましくは 20mer 以上の核酸、及びその誘導体に関する。また、配列表配列番号 4 で表される塩基配列のうち少なくとも一部の塩基配列を有する 12mer から 16mer 以上、さらに望ましくは 20mer 以上の核酸、及びその誘導体に関する。該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 をコードする塩基配列を有する、または配列表配列番号 2 で表される塩基配列を有する上記核酸を含有するベクターに関する。

## 【0024】

また、該ベクターを保持する 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 発現形質転換体に関する。また、該形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜に 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 を生成せしめることを特徴とする 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 またはその塩の製造方法に関する。該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 もしくはその塩、または該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の部分ペプチドまたはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 に対するリガンドの決定方法に関する。また、(i) 該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 もしくはその塩、または該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の部分ペプチドまたはその塩に、リガンドを接触させた場合と (ii) 該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 もしくはその塩、または該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行うことを特徴とするリガンドと該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法に関する。また、該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 もしくはその塩または該 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体に関する。

## 【0025】

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のアミノ酸配列を、配列表配列番号1に示し、それらをコードするDNA配列を配列表配列番号2に示した。

これらの配列をデータベース（GenBankリリース106.0, April, 1998年）で比較したところ、これらは新規な配列であった。また、特許配列データベースDGENE（Derwent Information Ltd., May 31, 1998年）で比較したところ、これらは新規な配列であった。

また、該7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の部分ペプチドを免疫原として各々に対する抗体（抗体を含有する抗血清も含む）を作製し、この7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の精製法を確立し、本発明を完成した。

【0026】

以下、本発明を詳細に説明する。

配列表において、配列番号1のアミノ酸配列は、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のアミノ酸配列である。

また、配列表配列番号2の配列は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の全アミノ酸配列及びそれをコードしているDNA配列であり、配列表配列番号3の配列は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のmRNA配列に相当するDNA配列であり、配列表配列番号4は、そのmRNA配列に相補的なcDNA配列である。

【0027】

配列表配列番号5および6は、メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の7回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインしたdegenerative PCR法のためのプライマーの塩基配列である。

配列表配列番号7および8は、C5L2の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマーの塩基配列である。

なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれアミノ基末端（以下、N末という）及びカルボキシル基末端（以下、C末という）であり、また塩基配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

【0028】

また、本発明で述べられる遺伝子操作に必要なcDNAの作製、ノーザンブロットによる発現の検討、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング、組換えDNAの作製、DNAの塩基配列の決定、cDNAライブラリーの作製等の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、例えばMolecular Cloning, A laboratory manual (1989年、Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press)を挙げるができる。

【0029】

本発明のポリペプチドは、少なくとも配列表配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドを有するが、自然界で生じることが知られている生物種内変異、アレル変異等の突然変異及び人為的に作製可能な点変異による変異によって生じる改変体も、配列表配列番号1のポリペプチドの性質を失わない限り配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものとして本発明の新規化合物に含まれる。そのアミノ酸の改変、置換に関しては例えばBennettらの特許出願(WO 96/02645)などに詳しく記載されており、これらを参考にして作製することができ、これらの方法によって改変、置換されたポリペプチドも本発明に含まれる。

【0030】

取得したC5L2クローンの中には、異なる配列を有するものが確認された。配列表配列番号2のDNA配列の724から729は、塩基Tが6個連続して並んでいるが、さらに塩基Tが1個付加されて7個連続しているクローンも複数検出された。本発明のC5L2のこの部位を含む核酸プローブ、核酸プライマーを利用することで、Tの付加したもの、付加されていないものを区別して検出することができる。

【0031】

配列表配列番号1のアミノ酸配列から、糖鎖が付加される部分が存在すると予想される。N-グリコシド結合の共通配列は、Asn-X-Ser/Thrであ

ることが知られているが、配列表配列番号 1 で 3 番目の A s n (A s n - A s p - S e r) がそれと同等な配列を有し N-グリコシド修飾を受けている可能性がある。また、N-アセチル-D-ガラクトサミンの O-グリコシド結合を推定する部分として、セリンまたはスレオニン残基が頻出する部分が考えられる。これらの糖鎖が付加された蛋白質の方がポリペプチドそのものよりも一般に生体内での分解に対して安定であり、また強い生理活性を有していると考えられる。従って、配列表配列番号 1 の配列を含有するポリペプチドのアミノ酸配列の中に N-アセチル-D-グルコサミンや N-アセチル-D-ガラクトサミンなどの糖鎖が N-グリコシドあるいは O-グリコシド結合してなるポリペプチドも本発明に含まれる。

#### 【0032】

また、実施例 1 に示す様に、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の天然の cDNA 断片は未成熟樹状細胞より調製した。従って、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の mRNA は未成熟樹状細胞に発現していることが示された。また、実施例 3 に示した様に本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の天然の mRNA は正常末梢血白血球中に検出することができた。また、実施例 2 に示す様に、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の天然の cDNA 全長は胎盤由来 cDNA ライブラリーから取得した。従って、これらの材料を用いても、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の天然の cDNA を取得することができる。mRNA は、細胞内のメカニズムにより蛋白質へと翻訳されるので、樹状細胞における本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の天然の mRNA の検出は 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の発現と同等と考えられる。

#### 【0033】

これら配列表配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含有する 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 またはその塩、または、その蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、診断を目的とした抗体の作成や、治療を目的とした医薬品の検索に有用である。

本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 と既知の遺伝子と cDNA 配列でのホモロジーを比較した。Genetyx-Mac/DB Ver. 39.1 を



用いてデータベース GenBank (リリース 106.0, April, 1998 年) で配列表配列番号 2 に示した塩基配列とのホモロジーをサーチした上位 10 種は、P. pygmaeus DNA for C5a receptor (エントリー名: PPC5AR) ホモロジー 56.3%、G. gorilla DNA for C5a receptor (GGC5AR) 56.7%、H. sapiens C5aR rRNA for C5 anaphylatoxin receptor (HSC5AR) 56.8%、Human C5a anaphylatoxin receptor mRNA, (HUMC5AAR) 56.8%、H. sapiens RNA for receptor for C5a anaphylatoxin (HSC5ANAPL) 56.8%、M. mullata DNA for C5a receptor fragment (MMC5AR) 56.2%、P. troglodytes DNA for C5a receptor (PTC5AR) 56.6%、C. familiaris mRNA for complement C5a receptor (CFCOM C5AM) 59.1%、Rattus norvegicus mRNA for C5a receptor (AB003042) 57.2%、R. norvegicus mRNA for C5a receptor (RNC5AREC) 57.2% であった。上記ソフトウェアによれば、ヒトを含めた各種アナフィラトキシン受容体 C5a-R (Kroll, Bら、FEBS Lett. 291, 208-210, 1991 年) と、約 56 から 59% 程度の塩基配列のホモロジーを示した。

【0034】

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2と既知の遺伝子とをアミノ酸配列でホモロジーを比較した。Genetyx-Mac/DB Ver. 39.1 (Software Development Co., Ltd.) を用いてSwiss-Prot (リリース35.0, November 1997年) でホモロジーをサーチした上位10種は、C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R) (CD88) (エントリー名:C5AR\_HUMAN) ホモロジー38.2%、C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R) (C5AR\_CANFA) 39.6%、C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R) (C5AR\_MOUSE) 38.1%、FMLP-RELATED RECEPTOR II (FMLP-R-II) (RFP) (HM63) (FML2\_HUMAN) 29.9%、FMET-LEU-PHE RECEPTOR (FMLP RECEPTOR) (N-FORMYL PEPTIDE RECEPTOR) (FMLR\_HUMAN) 28.8%、PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR1 (GPR1\_RAT) 28.1%、FMET-LEU-PHE RECEPTOR (FMLP RECEPTOR) (N-FORMYL PEPTIDE RECEPTOR) (FMLR\_RABIT) 29.8%、FMET-LEU-PHE RECEPTOR (FMLP RECEPTOR) (N-FORMYL PEPTIDE RECEPTOR) (FMLR\_MOUSE) 28.5%、PROBABLE G PROTEIN-

IN-COUPLED RECEPTOR GPR1 (GPR1\_HUMAN) 28. 1%、FMLP-RELATED RECEPTOR I (FMLP-R-I) (FML1\_HUMAN) 26. 3%であった。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2は、既知のヒトおよびその他のほ乳類の7回膜貫通型受容体蛋白質とアミノ酸配列で約30から40%程度のホモロジーを示した。

【0035】

該アミノ酸配列をKyte-Doolittleの方法(J. Mol. Biol. 157:105, 1982)に従って、アミノ酸配列から疎水性部分、親水性部分を解析した。その結果、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2は細胞膜通過部分を7つ有する細胞膜蛋白質として、細胞表面に発現されることが明らかとなった。

以上の結果から本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2は、既知のヒトおよびその他のほ乳類の7回膜貫通型受容体蛋白質とcDNA配列で60%以下、アミノ酸配列で40%以下のホモロジーを示す、新規なヒト7回膜貫通型受容体蛋白質であることが示された。

【0036】

既知の受容体の種間のホモロジーは、例えば、アンジオテンシン受容体Iaの場合、ヒト(Swiss-Prot Entry AG2R-Human)とラット(Swiss-Prot Entry AC22-Rat)間で90%を超える。従って、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2はこれまでヒト以外の種で知られている受容体蛋白質のヒトにおける対応物ではないと考えられる。しかし、ほかの7回膜貫通型受容体蛋白質とのホモロジーがせいぜい40%であり、本発明のペプチドC5L2が7回膜貫通型受容体に属する蛋白質であることがこのことから示された。これらのホモロジーから期待される既知のリガンドとしては、例えば、ケモカイン群やソマトスタチン、アンジオテンシン、ブラディキニンなどの小ペプチドのホルモンなどが挙げられる。

【0037】

最近報告されている様に、ヒトアナフィラトキシン受容体C5a-R(Kroll, Bら、FEBS Lett. 291, 208-210, 1991年)、ヒトアナフィラトキシン受容体C3a-R(Crass T. ら、Eur. J.

Immunol. 26、1944-1950、1996年)、菌由来ペプチドFMLP受容体(Boulay, F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 1103-1109, 1990年)、SchemR23(Samson, M. ら、Eur. J. Immunol. 28, 1689-100、1998年)等は、ホモロジーからみてGPCRファミリーの中でサブファミリーを形成している(Samson, M. ら、Eur. J. Immunol. 28, 1689-100、1998年)。本発明のC5L2においても、上記ホモロジーサーチの結果から、このファミリーに含まれると予想される。このサブファミリーに属する受容体が、例えばアナフィラトキシンの受容体C3a-RやC5a-Rの様に生体のアレルギーや炎症作用に関連し、例えばFMLP-R群の様に感染防御に関連し、例えばSchemR23の様に抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージを介した免疫誘導に関わることから、このサブファミリーの受容体は、炎症、感染による免疫調節に深く関与していることが示唆される。

#### 【0038】

配列表配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質の天然のmRNAに相当するDNA配列については、配列表配列番号3に示し、そのアミノ酸をコードしている部分の塩基配列を配列表配列番号2にアミノ酸配列とともに示した。これらの遺伝子配列に関し、アミノ酸レベルの変異が無くとも、自然界から分離した、染色体DNA、またはcDNAにおいて、遺伝コードの縮重により、そのDNAがコードするアミノ酸配列を変化させることなくDNAの塩基配列が変異した例はしばしば認められる。また、5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域はポリペプチドのアミノ酸配列の規定には関与しないので、それらの領域のDNA配列は変異しやすい。このような変異や遺伝コードの縮重によって得られる塩基配列も本発明のDNAに含まれる。以下、これらDNA群を本発明のDNAとよぶ。

#### 【0039】

他の既知の遺伝子を用いて一般的に行われているクロスハイブリダイゼーションを用いたスクリーニングでクローニングすることは、ホモロジーが非常に低い

ことから、困難であると考えられる。実際に、クロスハイブリダイゼーションのアプローチを用いた例も数多くあるが、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2はクローニングされていない（例えば、Murphy, P. M. ら、Science 253, 1280-1283, 1991年; Combadiere C. ら、J. Biol. Chem. 270, 16491-16494, 1995年）。実施例3に示す様に、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のcDNA配列の一部を用いてNorthern Blotting解析を行ったところ、既知の受容体遺伝子と考えられる転写産物は検出されなかった。また、実施例2に示す様に、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のcDNA配列の一部を用いてcDNAライブラリースクリーニングを行ったところ、既知の受容体遺伝子と考えられるクローンは検出されなかった。このことから、実際に既知の遺伝子を用いたクロスハイブリダイゼーションを用いたスクリーニングでクローニングすることは困難であることが示された。配列表配列番号2乃至4で示される塩基配列を有するDNAは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を作成する上で、また、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の詳細な機能を検討する上で有用である。

#### 【0040】

さらに、配列表配列番号3の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、および／または、配列表配列番号4の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、を用いれば、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のcDNAクローン、cDNA、ゲノムDNA、ゲノム遺伝子クローンなどを検出することができる。必要な核酸の長さはその配列の特異性、検出しようとしている核酸との結合の安定性によって異なるが、DNAを用いてPCR (Polymerase Chain Reaction) 法によって検出する場合には、 $T_m$  (2本鎖解離温度) が45℃以上であることが望ましい。PCRの様にDNA同志が結合する場合には、一つのGC結合を4℃とし、一つのAT結合を2℃として合算し、 $T_m$ を推定することができる。従って、GCコン

テントが高い場合には12merの核酸、一般的な50%ぐらいのGCコンテンツ領域で16merの核酸が必要となる。よりDNAとの結合が安定な核酸誘導体を用いる場合には、さらに短い核酸を用いて検出することが可能である。ハイブリダイゼーションによるcDNAクローンの検出の例は、実施例2に示した。

## 【0041】

例えば、遺伝子診断を目的としてこれらの遺伝子を調べる方法として、配列表配列番号3および4の一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、つまりDNA、RNA、及びそれらがメチル化、メチルフォスフェート化、脱アミノ化、またはチオフォスフェート化された誘導体を用い、ハイブリダイゼーション、PCR等の手法によって行うことが挙げられる。同様な方法でマウス等の他の生物の本発明の遺伝子の相同体の検出や遺伝子クローニングができる。さらに、ヒトを含めたゲノム上の遺伝子のクローニングも同様に可能である。従って、その様にしてクローニングされたこれら遺伝子を用いれば、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の更に詳細な機能も明らかにすることが出来る。例えば、近年の遺伝子操作技術を用いれば、トランスジェニックマウス、ジーンターゲッティングマウス、また、本発明の遺伝子と関連する遺伝子を共に不活化したダブルノックアウトマウスなどのあらゆる方法を用いることが出来る。また、本発明の遺伝子のゲノム上の異常があれば、遺伝子診断、遺伝子治療への応用も可能である。

## 【0042】

配列表配列番号4の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、をコードするDNAを用いれば、実施例4に示した様に本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2 mRNAの検出が可能である。例えば、診断を目的としてこれらの遺伝子の発現を調べる方法として、配列表配列番号4の一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の相補し得る核酸、つまりアンチセンスDNA、RNA、及びそれらがメチル化、メチルフォスフェート化、脱アミノ化、またはチオフォスフェート化された誘導体すなわちアンチセンス核酸を用い、ハイブリダイゼーション、プライマ

ーエクステンション、ヌクレアーゼ・プロテクション・アッセイ等の手法によって行うことが出来る。また、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の更に詳細な機能を明らかにすることを目的として、細胞や生体へのアンチセンス核酸の投与も考えられる利用法である。

#### 【0043】

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の過剰な反応が病態となっている疾患については、これらアンチセンス核酸により遺伝子の発現を抑えることによって、治療を行うことも可能である。また、アンチセンス核酸を適当なベクターに組み込み、そのベクターを用いることも可能である。これらアンチセンス核酸の作成例・使用例についてはMurray, J. A. H. 編「ANTISENSE RNA AND DNA」(Wiley-Liss, Inc., 1992年)に詳しい。

以上の様に、配列表配列番号3の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体、及び配列表配列番号4の遺伝子配列の少なくとも一部の遺伝子配列を有する12merから16mer以上、さらに望ましくは20mer以上の核酸、及びその誘導体は、診断、治療などに有用である。

#### 【0044】

本発明の核酸を含有するベクターとしては、例えば大腸菌由来のpBR322, pUC8, pUC19, pUC18, pUC119 (いずれも日本国宝酒造社製) などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で複製増殖できるものであればいずれも用いることができる。実施例4にベクターとしてpcDNA3.1/Myc-His(+)-Bを、宿主として大腸菌を用いた例を示した。また本発明のDNAを含有するファージベクターとしては、例えばλgt10, λgt11 (米国Stratagene社製) などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであれば用いることができる。この様にして、得られたベクターは適当な宿主、例えばエシェリヒア(Escherichia) 属菌、バチルス(Bacillus) 属菌、などにカルシウムクロライド法等を用いて導入し、本発明のDNAを含有するベクターを保持する形質転換体を作

成することができる。上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア コリ K12 HB101, MC1061, LE392, JM109、INV $\alpha$ F' などが挙げられる。上記バチルス属菌の例としてはバチルス サチリスM1114等が挙げられる。また、ファージベクターは、例えば増殖させた大腸菌にインビトロパッケージング法 (Proc. Natl. Acad. Sci. 71:2442, 1978年) を用いて導入することができる。

【0045】

尚、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の全アミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドpcDNAC5L2を大腸菌DH5に遺伝子導入した形質転換細胞(実施例4) E. coli: DH5-pcDNAC5L2は、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年9月1日に受託番号: FERM P-16976として寄託されている。

【0046】

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2をコードする塩基配列を有する核酸を含有するベクターは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2をコードする塩基配列を有する核酸を製造する上で、また、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の核酸を保持する形質転換体を作成する上で有用である。上記の方法にて作成した本発明の核酸を用いた7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の発現には、成書によって知られている (Kriegler, Gene Transfer and Expression-A Laboratory Manual, Stockton Press, 1990年; および横田ら、バイオマニュアルシリーズ4, 遺伝子導入と発現・解析法, 羊土社, 1994年)、多数の方法が用いられる。すなわち、分離した7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のアミノ酸配列をコードするcDNAを適当な発現ベクターにつなぎ、動物細胞、昆虫細胞などの真核細胞、バクテリアなどの原核細胞を宿主として生産させることができる。

【0047】

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を発現させる際に、本発明のポリペプチドをコードする核酸はその5'末端に翻訳開始コドンを含し、また、3'

末端には翻訳終止コドンを含んでいてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは適当な合成核酸アダプターを用いて付加することもできる。更に該DNAを発現させるには上流にプロモーターを接続する。ベクターとしては上記の大腸菌由来プラスミド、枯草菌由来プラスミド、酵母由来プラスミド、あるいはλファージなどのバクテリオファージおよびレトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルスなどが挙げられる。

【0048】

本発明に用いられるプロモーターとしては、遺伝子発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、*tac*プロモーター、*trp*プロモーター、*lac*プロモーターなどが好ましく、宿主がバチルス属菌である場合には*SPO1*プロモーター、*SPO2*プロモーターなどが好ましく、宿主が酵母である場合には*PGK*プロモーター、*GAP*プロモーター、*ADH*プロモーターなどが好ましい。宿主が原核細胞である場合には、プロモーターとともにリボソーム結合部位をもつことが好ましい。

【0049】

宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタルチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが利用できる。

本発明のポリペプチドを発現させる時、配列表配列番号1のアミノ酸配列と実質的に同等な蛋白質をコードする核酸のみでもよいが、膜表面への発現を保証する必要がある場合には、既知シグナルペプチドをコードする核酸をN末に付加したり、産生されたポリペプチドの検出を容易にするための既知抗原エピトープをコードする核酸を付加することで、特別の機能を付加した蛋白質を生産させることもできる。このような技術の一つの例として、Choe, H. ら、Cell, 85, 1135-1148, 1996年を挙げることができる。

【0050】

本発明者らは、実施例4に示したごとく、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を発現する発現ベクターとして配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列をコード



するDNAを発現ベクターp cDNA3. 1MycHis (+) B (Invitrogen社)につなぎ、本発明のDNAを含む発現ベクターを作製した。この発現ベクターによって発現される本発明のC5L2蛋白質は、ベクターに用意されていたMycとHisタグのペプチドが人工的に付加されている。この様にして構築された7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2をコードするDNAを含有する発現ベクターを用いて、本発明のDNAを含むベクターを保持する形質転換体を製造する。

## 【0051】

宿主としては例えばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。動物細胞としては、例えばサル細胞であるCOS-7, Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO, カイコ細胞SF9などが挙げられる。

この様にして得られる本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2をコードする塩基配列を有する核酸を含有するベクターは、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を産生する上で有用である。

## 【0052】

実施例5, 7に示したごとく、上記の発現ベクターを遺伝子導入し、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2をCHO細胞、293細胞などで発現させ、これら発現プラスミドで形質転換された形質転換体を得られる。これらの形質転換体は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を産生する上で有用である。本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2と実質的に同等な蛋白質をコードする塩基配列を有する核酸を含有するベクターを保持した形質転換体を作成し、それぞれ公知の方法により、適当な培地中で適当な培養条件により培養することによって、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2またはその塩を製造することができる。例えば実施例5の様にWestern blottingを用いたり、また、FACSによって検査することにより、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の生産を確認することができる。

## 【0053】

この様にして作成した、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2またはその塩を用いて、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のリガンドを決定す

ることができる。そのためには、まず、リガンド候補である試験化合物を、純化した、または、未精製の、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 と接触させ、試験化合物の本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 に対する結合もしくはその結合により引き起こされる反応を測定する。試験化合物の本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 に対する結合を測定する場合には、純化した、または、未精製の本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 と試験化合物を接触させ、複合体量および／または未結合の試験化合物量を測定する。複合体量および／または未結合の試験化合物量を測定する方法としては、例えば、放射性化合物や色素などを用いて試験化合物を標識し、複合体と未結合の試験化合物を分離し、標識を用いて複合体量および／または未結合の試験化合物量を測定する。この一つの例を実施例 6 に示した。

#### 【0054】

受容体と結合する化合物が知られている場合には、その化合物を標識し、試験化合物が標識化合物と競合するかどうかをもって、試験化合物の結合を測定することもできる。これらの方法の例として、浅沼幹人ら、実験医学 11, 22-29, 1993 年に挙げられている方法がある。そのほかにも、SPA (Scintillation Proximity Assay) の様に複合体と未結合の試験化合物を分離せずに測定する方法もある。

#### 【0055】

一方、試験化合物と本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の結合により引き起こされる反応を測定する場合には、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 の共役しているシグナル伝達系によって様々な方法が考えられる。このような方法として、例えば唐木英明ら編、実験医学 7, pp 26-109, 1989 年の様に細胞内カルシウムを測定する方法、Samson, M. ら、Biochem. 35, pp 3362-3367, 1996 年の様にマイクロフィジオメーターを用いる方法、細胞内 cAMP の量を測定する方法、などがある。リガンドとの結合によって引き起こされる反応を測定する 1 つの例を実施例 7 に示した。これら C 5 L 2 蛋白質もしくはその塩、または、その部分ペプチドまたはその塩と試験化合物を接触させる C 5 L 2 蛋白質に対するリガンドを決定する方法は

7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2に結合して樹状細胞の反応を制御する、疾患の治療を行う物質を検索する上で有用である。

【0056】

さらに上記の様に、リガンド、すなわち、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2に作用するものを発見した場合には、その作用の変化、すなわち、その活性化を行ったり、活性化を阻害したりする物質を検索することが可能である。そのことは、(i) 7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii) 7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行うことによって行うことができる。その一つの例を実施例8に示した。この方法は、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2に作用して樹状細胞の反応を制御する、疾患の治療を行う物質を検索する上で有用である。

【0057】

7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を特異的に認識する抗体は実施例9に示した様に作製することができる。抗体を作製するためのペプチドの長さは特に限定されないが、C5L2蛋白質を特徴づけられる長さがあればよく、好ましくは6アミノ酸以上、特に好ましくは8アミノ酸以上のペプチドを用いればよい。このペプチドをそのまま、またはKLH (keyhole-limpet hemocyanin) やBSA (bovine serum albumin) といったキャリア蛋白質と架橋した後に必要に応じてアジュバントと共に動物へ接種せしめ、その血清を回収することでC5L2蛋白質を認識する抗体(ポリクローナル抗体)を含む抗血清を得ることができる。また、抗血清より抗体を精製して使用することも可能である。接種する動物としては、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギが好ましい。また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法によりモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合にはマウスが好ましい。また、配列番号1に示したアミノ酸の全長または6残基以上、望ましくは8残基以上のアミノ酸配列をGST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) などと融合さ

せたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書 (Antibodies a laboratory manual, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory) に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組換え体抗体によっても作製することができる。この様に作製された抗体は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の精製に利用できる。

【0058】

また、実施例9に示したこれらの7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を特異的に認識する抗体を用いれば、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の検出、測定が可能であり、細胞の分化異常を伴う疾患や自己免疫疾患、例えば悪性腫瘍、ウィルス感染、リウマチなどの疾患の診断薬として使用でき得る。また、実施例5に示す様に、この検出、測定には、Western Blotting, FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) などを用いることができる。FACSを用いた臨床診断の例は、例えば、天神美夫ら編「フローサイトメトリーハンドブック」(サイエンスフォーラム社、1984年)の第4部 フローサイトメトリーの臨床医学への応用、に示されている。これら検出、測定については、Western Blotting (Immunoblotting) に関してはAntibodies a laboratory manual (E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory) pp471-510にその方法の詳細が、免疫沈降、免疫測定などに関しては、同書pp421-470, pp553-612にそれぞれ詳細が記されている。FACSの際の細胞の染色については、高津聖志、瀧伸介「免疫研究の基礎技術」(羊土社、1995年)、pp16-61に、FACSの操作については、天神美夫ら編「フローサイトメトリーハンドブック」(サイエンスフォーラム社、1984年)に詳細が示されている。

【0059】

以上の様に、配列表配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミ

ノ酸配列を含有することを特徴とする7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体は本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を発現している細胞を同定する上で有用である。

【0060】

【発明の実施の形態】

以下に発明を実施する形態について例を示すが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0061】

【実施例1】

新規7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2遺伝子断片の取得

健常人末梢血1リットル分から、バフィーコートを回収し、有核細胞を37℃、5%炭酸ガス雰囲気下で14日間培養し、未成熟樹状細胞に分化させた。培地は、RPMI-1640培地に10%牛胎児血清(FBS: Inter gen社)、100ng/mlヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、50ng/mlヒトインターロイキン-4(IL-4)、antimycotic-antibiotics (Gibco BRL社)を添加したものを使用した。培養は、必要に応じ新鮮培地に交換した。これにより、末梢血白血球からの未成熟樹状細胞 $1 \times 10^7$ 個を得た。この細胞を1000rpmで15分の遠心後、上清を吸引・廃棄し、PBS液(Phosphate Buffered Saline; 大日本製薬(株)社製 Cat. No. 28-103-05)を30ml加え懸濁後、再度同じ条件で遠心した。

【0062】

以下、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech社製)を用い、製造者のプロトコル(Rev. 4. XV-025-00-07)11~14頁に従って(second column purificationは行わなかった)、mRNAを抽出した。エタノール沈殿後、Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold S

pring Harbor Laboratory Press) のE5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNAに従って定量した。1 $\mu$ gのmRNAを用い、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Life Technologies社製)を用いてcDNA合成を行った。プロトコル11~17頁(Protocol 1および2)に従い、oligo(dT)プライマーを用いて2重鎖(ds)DNAを合成した。その後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿後、40 $\mu$ lの滅菌水に溶解した(これをcDNAサンプルと呼ぶ)。

## 【0063】

このcDNAサンプルのうち2 $\mu$ lを用いてPCR(polymerase chain reaction)を行った。PCRはTaqポリメラーゼ(宝酒造社製、コードR001A)を用いた。酵素に添付のバッファーを5 $\mu$ l, 酵素に添付のdNTP mixture 4 $\mu$ lと配列表配列番号5に示した合成オリゴヌクレオチドおよび、配列表配列番号6に示した合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ200 pmolを加え、最終容量50 $\mu$ lとした。

この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、95℃1分、40℃2分、72℃3分を5サイクル行った後、95℃1分、50℃2分、72℃3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド(日本ジーン社製)にて染色後、紫外線下で観察し、約700bpのcDNAが増幅されていることを確認した。このバンドをゲルから切り出して GENE CLEAN II Kit (フナコシ社製)を用いて精製後、TA cloningキット(Invitrogen社製)を用いてクローニングした。

## 【0064】

すなわち、ベクターとしてpCR2.1 Vector (Invitrogen社製、以下pCR2.1という)を用い、ベクターと先のDNAとをそのモル比が1:3となる様に混ぜ合わせて、T4 DNAリガーゼ(Invitrogen社製)にてベクターにDNAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクター

pCR2.1を大腸菌One Shot Competent Cells (Invitrogen社製)に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma社製)を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 含むL-Broth (宝酒造社製)半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度 $37^{\circ}\text{C}$ に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地 $2\text{ml}$ に植え付け、8時間程度 $37^{\circ}\text{C}$ で震とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega社製)を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素EcoRIにて消化して、約 $700\text{bp}$ のDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているcDNAの塩基配列決定を行った。

## 【0065】

挿入cDNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製はPRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いて行なった。 $0.5\text{ml}$ 容のマイクロチューブに $9.5\mu\text{l}$ の反応ストック液、 $4.0\mu\text{l}$ の $0.8\text{pmol}/\mu\text{l}$ のT7プロモータープライマー (GIBCO BRL社製)および $6.5\mu\text{l}$ の $0.16\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のシーケンス用鋳型DNAを加えて混合し、 $100\mu\text{l}$ のミネラルオイルを重層後、 $96^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $55^{\circ}\text{C}$ 15秒および $60^{\circ}\text{C}$ 4分を1サイクルとするPCR増幅反応を25サイクル行ない、 $4^{\circ}\text{C}$ で5分間保温した。反応後、 $80\mu\text{l}$ の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を3回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。 $100\mu\text{l}$ の水層に $10\mu\text{l}$ の3M酢酸ナトリウム ( $\text{pH}5.2$ )および $300\mu\text{l}$ のエタノールを加えて攪拌後、室温、 $14,000\text{rpm}$ にて15分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を75%エタノールで洗浄後、真空下に2分間静置して乾燥させ、シーケンス用サンプルとした。シーケンスサンプルは、 $4\mu\text{l}$ の $10\text{mM}$ のEDTAを含むホルムアミドに溶解して $90^{\circ}\text{C}$ 、2分間で変性後、氷中で冷却してシーケンスに供した。

## 【0066】

約250のクローンについてDNA配列決定を行ったところ、1個のクローンが配列表配列番号2のDNA配列の235番目から852番目に対応する配列を有していた（両端のプライマーの配列を含まない）。GenBankリリース106.0, April, 1998年のサーチの結果、この配列は7回膜貫通型受容体群と類似していることが判明した。

【0067】

# 【実施例2】

新規7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2全長遺伝子の取得

ヒト胎盤組織由来のcDNAライブラリー（CLONTECH社）からブラークハイブリダイゼーションにて全長cDNAを持ったクローンの取得を行った。10<sup>6</sup>個相当のブラークをMolecular Cloning, A laboratory manual (1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Pressの2.109-111, Immobilization of bacteriophage  $\lambda$  plaques on nitrocellulose filters)に従ってプレートに蒔き、出現したブラークをナイロンフィルター（Hybond N+; Amersham社製）に転写し、転写したナイロンフィルターをアルカリ処理（1.5M NaCl, 0.5M NaOHを染み込ませた濾紙上に5分間放置）し、次いで中和処理（1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.5)を染み込ませた濾紙上に5分間放置）を2回行い、次に2×SSC溶液（1×SSC溶液は0.15M NaCl, 15mMクエン酸pH 7.0）中で5分間、2度振とう洗浄し風乾した。その後、UVクロスリンカー（フナコシ社製、モデルCL-1000）を用いて、このフィルターの紫外線照射を1200×160マイクロジュール/cm<sup>2</sup>で行った。このフィルターを用いて放射性同位元素<sup>32</sup>Pにて標識されたヒト7回膜貫通型受容体蛋白質遺伝子C5L2遺伝子断片をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。

【0068】

放射性同位元素<sup>32</sup>Pにて標識されたC5L2遺伝子断片プローブは以下の様に



作製した。すなわち、C5L2遺伝子断片が組み込まれたベクターpCR2.1より、制限酵素EcoRIにてベクターより切り出し、0.8%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約700bpのバンドをゲルから切り出してGENECLEAN II Kit（フナコシ社製）を用いて精製した。得られたDNA断片をDNAラベリングキット（Megaprime DNA labeling system: Amersham社製コードRPN1607）を用いて標識した。すなわち、DNA100ngにプライマー液10 $\mu$ l、5 $\times$ 反応緩衝溶液20 $\mu$ l及び脱イオン水を加えて全量を86 $\mu$ lとして沸騰水浴を5分間行い、その後、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP（アマーシャム社製、コードAA 0005）10 $\mu$ l、及びKlenow酵素溶液4 $\mu$ lを加えて、37℃で10分間水浴し、放射標識したC5L2断片を合成した。更にその後、セファデックスカラム（Quick Spin Column Sephadex G-50: 独逸国ベーリンガーマンハイム社製）で精製し、5分間沸騰水浴をしたのち、2分間氷冷後使用した。

【0069】

前述の方法にて作成したフィルターを、各々の成分の最終濃度が6倍濃度のSSC溶液、5倍濃度のデンハルト液（和光純薬社製）、0.5% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬社製）、及び100 $\mu$ g/mlの沸騰水浴により変性したサケ精子DNA（Sigma社製）を含むハイブリダイゼーション液中に浸し、65℃にて2時間振とうしたのち、前述の方法で<sup>32</sup>P標識されたプローブをハイブリダイゼーション液に添加し、65℃にて16時間振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。

【0070】

次に、フィルターを0.1% SDSを含む、各々の成分の最終濃度が2倍濃度のSSC溶液に浸し、室温で3回洗浄後、さらに同溶液で室温で15分間洗浄した。洗浄を終了したフィルターを増感スクリーンを使用して、-85℃でオートラジオグラフィーを行った。その結果、強く露光された部分のクローンを拾い、再度ブランクを蒔き直し前述の方法にてスクリーニングを行い、完全に単独のクローンを分離した。

【0071】

単離されたファージクローンのうち2クローンを以降の遺伝子配列決定に供した。Molecular Cloning, A laboratory manual (1989, Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) の2.70の方法に従い、これらのすべてのクローンのファージを約 $10^9$  pfu (plaque forming unit) 調製し、Wizard lambda preps (Promega) を用いてファージDNAを精製し、制限酵素EcoRIにて消化し、同様に制限酵素EcoRIで消化したプラスミドpBluescript II KS (+) (Stratagene社製) に組み込んだ。これらのクローンのDNA配列をDNAシーケンサーにより解析し、配列表配列番号3に示す塩基配列を決定した。配列表配列番号2は、配列表配列番号3のうちC5L2のタンパク質をコードしている部分の塩基配列である。このC5L2の蛋白質をコードしているDNAを含むプラスミドをpBSC5L2と命名した。

【0072】

【実施例3】

Northern Blottingによる解析

実施例1, 2で得られたヒト7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の各臓器におけるmRNA発現をNorthern Blottingで解析した。Multiple Tissue Northern (MTN) Blotsフィルター (CLONTECH社製、コード#7757-1、#7759-1、#7760-1及び#7767-1) を用い、5倍濃度のSSPE溶液 (1倍濃度のSSPE溶液は0.15M NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, pH7.4)、10倍濃度のデンハルト液 (和光純薬社製)、2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬社製)、終濃度50%ホルムアミド (和光純薬社製)、及び沸騰水浴により変性したサケ精子DNA (100 µg/ml; Sigma社製) を含むハイブリダイゼーション液中に浸し、50℃にて2時間振とうした後、実施例2と同様の方法で<sup>32</sup>P 標識されたC5L2遺伝子の3'末端側のN

a e I - E c o R I 断片プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、50℃にて16時間振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。

【0073】

次に、フィルターを、0.1% SDSを含む、各々の成分の最終濃度が0.1倍濃度のSSC溶液中で、50℃ 20分間2回、60℃ 20分間1回洗浄した。洗浄後のフィルターを増感スクリーンを使用して、-85℃でオートラジオグラフィーを行った。その結果、末梢血白血球及び脾臓で約2.4 Kbに非常に強いバンドが検出された。また、骨髄、リンパ節、脊髄、腎臓、肝臓、肺、胎盤、心臓でも弱い発現が確認された。ややサイズの大きい強いバンドが末梢血白血球、脾臓、精巣で確認された。脳、骨格筋、膵臓、胸腺、前立腺、胃、甲状腺、気管、副腎、胎児脳、胎児肺、胎児肝、胎児腎臓では、検出されなかった。

【0074】

未成熟樹状細胞でもこのバンドが検出されたが、成熟した樹状細胞ではバンドが検出されなかった。このことから、成熟することによって、C5L2の発現が消失することが示された。

【0075】

【実施例4】

7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2発現ベクターの作製

実施例2で単離されたC5L2全長遺伝子を含むプラスミドクローンを鋳型としてC5L2遺伝子のPCR (polymerase chain reaction) を行った。PCRにはHigh Fidelity Taqポリメラーゼ (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた。このプラスミド溶液1  $\mu$  l (DNA 5 ngを含む) に脱イオン水37.5  $\mu$  l、Taqポリメラーゼ0.5  $\mu$  lと、Taqポリメラーゼに添付のバッファー5  $\mu$  lと、2.5 mM dNTP mixture (宝酒造社製) 4  $\mu$  lと、配列表配列番号7に示したオリゴヌクレオチド (配列表配列番号2の塩基配列の1番目のAから22番目のTの22塩基配列の5'末端にスペーサー配列GGGGと制限酵素HindIIIの酵素配列AGCTTを加えたもの)、および配列表配列番号8に示したオリゴヌクレオチド (配列表配列番号4の塩基配列の206番目のCから225番目のAの20塩

基配列の5'末端にスパーサー配列GGGAと制限酵素SacIIの酵素配列CCGCGGを加えたもの)を、それぞれ20ピコモル加え、最終容量50 $\mu$ lとした。

#### 【0076】

この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、96℃1分、60℃1分、72℃2分を20サイクル行ったのち、72℃7分の反応を行った。このPCR産物の一部を0.8%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド(日本ジーン社製)にて染色後、紫外線下で観察し、約1150bpのcDNAが増幅されていることを確認した。このPCR反応溶液を、常法に従い、フェノール・クロロホルム処理してエタノール沈殿した。遠心してDNAを回収した後、蒸留水にて溶解し、制限酵素HindIII、SacIIで順次消化した。その後、消化した反応液を0.8%アガロースゲル上で分離し、目的とする遺伝子産物をゲルから切り出し、GENECLEAN IIを用いて、DNAの精製を行った。この精製DNAを、上述と同様な方法で、制限酵素HindIII、SacIIで消化、精製したpcDNA3.1/Myc-His(+)-Bとライゲーションキットver2(宝酒造社製)により連結して、大腸菌DH5コンピテントセル(宝酒造社製)に遺伝子導入した。アンピシリン(Sigma社製)を50 $\mu$ g/ml含むL-Broth(宝酒造社製)半固型培地のプレートに菌を蒔き、12時間程度37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地2mlに植え付け、18時間程度37℃で振とう培養後、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ(Promega社製)を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離した。このプラスミドを制限酵素HindIII、SacIIにて消化し、約1150bpのDNAが切り出されたクローンについて、組み込まれているDNAの塩基配列決定を行い、C5L2の発現ベクター、pcDNAC5L2を得た。

#### 【0077】

なお、このプラスミドpcDNAC5L2を大腸菌DH5に導入した菌株E.coli:DH5-pcDNAC5L2は、日本国通商産業省工業技術院生命工

学工業技術研究所に平成10年9月1日に受託番号：FERM P-16976  
として寄託されている。

【0078】

【実施例5】

発現ベクターの細胞への遺伝子導入と発現

実施例4で作製した発現ベクターを293細胞（大日本製薬（株）から入手可能、ATCC番号CRL-1573）に遺伝子導入した。遺伝子導入前の細胞の継代は、MEM with Earles Salts（MEMアール液体培地、大日本製薬（株）Cat. No. 12-102-54CN）を用い、10%馬血清（56℃20分間熱処理して非働化した；ICN Biomedicals, Inc. Cat. No. 2921149）、100分の1量のPenicillin-Streptomycin溶液（大日本製薬（株）Cat. No. 16-70D-49DN）を加えた。細胞は、 $5 \times 10^4$ 個/mlから $5 \times 10^5$ 個/mlの濃度で培地中に植え付け、37℃、5%二酸化炭素、湿度100%で培養し、コンフルエントになるまで培養した。培地を吸引・廃棄し、EDTAトリプシン液（Cosmo Bio Co., Ltd.）処理し、前記の培地（血清を含む）を加えて反応を停止後、細胞をプレート底面より剥がした。その後、ピペティングによって細胞を均一に懸濁し、遠心して（1000rpm 15分；KS-8300型、久保田製作所、RS3000/6型ローター）回収し、新しい培地に再度懸濁し継代した。遺伝子導入は、Invitrogen社のキット（Cat. No. IV2780-1）を用いリン酸カルシウム共沈法にて行い（添付のプロトコル6ページ）、本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2をコードするDNAを保持する形質転換体を作成した。DNAは35mmプレート当たり5 $\mu$ gを用いた。

【0079】

膜画分の調製は、以下の様に行った。pC5L2を遺伝子導入した細胞およびpcDNA3.1プラスミドを導入した細胞を48～72時間培養した。その後、培地はアスピレータで吸引し廃棄し、PBS（大日本製薬（株）Cat. No. 28-103-05）を用いて細胞を洗浄し、その後1ml/プレートのPB

Sで希釈したEDTA（大日本製薬（株）Cat. No. 28-203-49）液を加え、Cell Scraper-L（住友ベークライト、Cat. No. MS-93300）を用いてプレートから剥がした。その後、1ml/プレートのPBSを加え、プレートを洗浄し、回収した細胞に加えた。この細胞懸濁液をPBSで2回洗浄後、0.5ml HEPES/Protease Inhibitor液（Boehringer社のprotease Inhibitor; Completeを25mM HEPES pH7.4に溶解した液）で懸濁し、マイクロチューブに移した。この細胞懸濁液を26G注射針を付けたシリンジでホモゲナイズし、マイクロチューブ用遠心機（トミー精工、MRX-150型）で4℃、3000rpmで5分間遠心した。その上清を回収し、15000rpmで15分間遠心した沈殿物を回収した。この沈殿物は、2度HMS液（50mM HEPESバッファーpH7.4、5mM  $MgCl_2$ 、150mM NaCl）で洗浄後、100 $\mu$ lのHMS液の懸濁液とした。パイオ・ラッド社のプロテインアッセイキットを用いて蛋白質を定量し、蛋白質量が1mg/mlになるようPBSを加えて調製した。この懸濁液を膜画分調製液とした。

## 【0080】

こうして得られた膜画分調製液を用いてウェスタンブロッティング法にて7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の発現を確認した。すなわち、膜画分をACIジャパン社製のSDS-PAGE用電気泳動槽及びSDS-PAGE用ポリアクリルアミドゲル（グラジエントゲル5～15%）を用い、添付の取扱い説明書に従ってSDS-PAGE（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）を行った。サンプルは2-メルカプトエタノール（2-ME）を加えて5分間の沸騰水浴加熱処理により還元処理を行った。マーカーとしてはAmersham社製レインボーマーカー（高分子量用）を用い、サンプルバッファー、泳動バッファーについては添付の取扱い説明書に従って作製した。SDS-PAGE終了後、アクリルアミドゲル中の蛋白質をPVDFメンブランフィルター（BioRad社製）に同社製ミニトランスブロットセルにより転写した。

## 【0081】

この様に作製されたフィルターをブロックエース（大日本製薬社製）液に4℃

で一晩振とうしてブロッキングした。その後、TBS-T (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl (pH7.6)、0.1%Tween 20) でフィルターを洗浄後、ECLウエスタンブロッティング検出システム (Amersham社) に添付の説明書に従い、一次抗体として実施例9に記載した抗C5L2抗血清を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (Amersham社製) を反応させた。

【0082】

抗体の反応時間は各々室温で一時間反応させ、各反応間はTBS-Tにて10分間室温で振とう洗浄する操作を3回ずつ繰り返した。最後の洗浄後、フィルターをECLウエスタンブロッティング検出システム (Amersham社製) の反応液に5分間浸し、ポリ塩化ビニリデンラップに包んでX線フィルムに感光させた。分子量マーカールとの比較の結果、約38~42kDのバンドが遺伝子導入をしたものについてのみ得られ、遺伝子導入をしていない細胞には観察されなかった。

【0083】

【実施例6】

リガンドのスクリーニング

遺伝子導入を行わない293細胞とC5L2形質転換体293細胞の膜面分を実施例5と同様にして調製した。膜面分調製液50 $\mu$ lもしくはPBS (大日本製薬(株) Cat. No. 28-103-05) と放射性標識された候補化合物CGS 21680 (DuPont NEN社、カタログ番号 NET-1021) 50 $\mu$ l (終濃度100nM)、PBS 50 $\mu$ lを加え、全量を150 $\mu$ lとした。混合して候補化合物と7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2を接触させ、37℃で30分間保温した後、マイクロチューブ用遠心機 (トミー精工、MRX-150型) で室温、15000rpmで15分間遠心し、C5L2蛋白質と結合した候補化合物と結合していないものを分離した。その上清1 $\mu$ lを、10mlの液体シンチレーター用カクテル (DuPont NEN, ECONOFUOR-2) に加え、混合した。その後、Beckman LS6000LL型シンチレーションカウンターを使用して放射活性をカウントし、C5L2遺伝子

導入の有無で得られた放射活性を比較した。

その結果、得られた放射活性はC5L2遺伝子導入の有無で差がなかった。

【0084】

【実施例7】

リガンドのスクリーニング

実施例4で作製した発現ベクターをCHO細胞（大日本製薬（株）から入手可能、ATCC番号CCL-61）に遺伝子導入した。遺伝子導入前の細胞の継代は、F-12 Nutrient Mixture（HAM培地、GIBCO BRLカタログ番号11765-047）、最終濃度10%のFBS（Fetal Bovine Serum; GIBCO BRL Cat. No. 10099-141; 56℃20分間熱処理して非働化した）、100分の1量のPenicillin-Streptomycin溶液（大日本製薬（株）Cat. No. 16-70D-49DN）を用いた。細胞は、 $5 \times 10^4$ 個/mlから $5 \times 10^5$ 個/mlの濃度で培地中に植え付け、細胞培養用インキュベーターにて、37℃、5%二酸化炭素環境下でコンフルエントになるまで培養した。培地は吸引・廃棄し、EDTAトリプシン液（Cosmo Bio Co., Ltd.）処理後、前記の培地（血清を含む）を加えて反応を停止させ、細胞をプレート底面より剥がした。その後、細胞を回収し、ピペッティングによって細胞を均一に懸濁し、遠心（1000rpm 15分; KS-8300型、久保田製作所、RS3000/6型ローター）にて回収した。新しい培地に再度懸濁し、継代した。

【0085】

遺伝子導入は、Invitrogen社のキット（Cat. No. IV2780-1）を用いリン酸カルシウム共沈法にて行った（添付のプロトコル6ページ）。DNAは35mmプレート当たり5μg用いた。遺伝子導入後、約6時間後に新しい培地と交換し、さらに約48時間培養した。さらに培養上清を、種々の細胞濃度で400μg/mlの濃度のジェネティシン（Geneticin, GIBCO BRL 1811-023）を含む培地に植え替えた。その後、2週間前後培養し、増殖した細胞をC5L2発現細胞とした。



## 【0086】

以上のように作成した7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2発現細胞を用いて、化学遊走の測定を行った。リガンド候補物質としては、LPS（リポポリサッカライド）投与ラット血清を用いた。7週令のWistarラットを（株）日本生物材料より購入した。サルモネラミネソタRE595由来LPS（Sigma社製）を日本薬局方生理食塩水に最終濃度1mg/mlになる様に懸濁した。懸濁液をソニケーター（Branson）でソニケートし、透明な液とした。これを日本薬局方生理食塩水で10倍に希釈し、400 $\mu$ l、尾静脈より投与した。投与後約22時間後のラットをエーテル麻酔し開腹して心臓より採血した。マイクロチューブ用遠心機（トミー精工、MRX-150型）で4℃、13000rpmで15分間遠心し、その上清を-20℃で保存した。これを被検物質溶液とした。

## 【0087】

96穴マイクロプレートチャンバー（フナコシ（株）カタログ番号FE-2292-96）に96穴マイクロプレート（フナコシ（株）カタログ番号FE-2300-02）および15 $\mu$ g/mlのフィブロネクチン（Sigma, PBS（大日本製薬（株）カタログ番号28-103-05）中に溶解した）で処理した8 $\mu$ mのポアサイズのフレームフィルター（フナコシ（株）カタログ番号FE-2340-08）を据え付けた。下室には0.15%BSA（Sigma社製）を含むRPMI 1640培地（GIBCO BRLカタログ番号22400-071）で被検物質溶液を10倍希釈して加えた。上室には0.15%BSAを含むRPMI 1640培地に懸濁した7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2発現細胞を加え、被検物質とC5L2蛋白質を接触させた。この状態の96穴マイクロプレートチャンバーを5%二酸化炭素、37℃で5時間保温した。フィルターを固定・染色して顕微鏡下で観察した。その結果、化学遊走している細胞が観察された。

## 【0088】

## 【実施例8】

リガンドと拮抗する物質のスクリーニング

C5L2形質転換293細胞を用い形質転換体の細胞増殖試験を行った。(i) 実施例7で作製したC5L2形質転換CHO細胞に発現する7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2と実施例7に示したLPS投与ラット血清をリガンドとして用いて実施例7と同様に化学遊走している細胞を観察した。さらに、(ii) 実施例7の実験の際に上室および下室に含まれる溶液に最終濃度100  $\mu$ MのNECA(N-エチルカルボキシアミドアデノシン、Sigma社製)を加えて実施例7と同様に化学遊走している細胞を観察した。(i), (ii)を比較したが、両者に差はなかった。

【0089】

#### 【実施例9】

C5L2蛋白質を認識する抗体の作成

配列表配列番号1の6番目から32番目のアミノ酸からなるペプチドを合成した。その際、キャリアー蛋白質との結合反応のためにN末端にシステイン残基を導入した。そして Imject Activated Immunogen Conjugation Kit with KLH and OVA (PIERCE社:77107)を用いてKLH(Keyhole limpet hemocyanin)、OVA(Ovalbumin)と合成ペプチドをコンジュゲートし、免疫原とした。これをウサギに免疫し、抗体価の測定後全血の採血を行い、血清を採取した。これをBioRad社製のエコノパック血清IgG精製キットを用いて、添付の取扱説明書に従って、抗ヒトC5L2蛋白質ウサギポリクローナル抗体を精製して作製した。

【0090】

#### 【発明の効果】

本発明の7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2は、樹状細胞の機能を制御する医薬品を検索することに使用が可能である。

【0091】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

<120> 新規受容体蛋白質C5L2

<130> X10-00844

<160> 8

<210> 1

<211> 337

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Gly	Asn	Asp	Ser	Val	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Asp	Leu
1				5						10				15	
Ser	Asp	Arg	Pro	Val	Asp	Cys	Leu	Asp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Ile	Asp
				20						25				30	
Pro	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Leu	Pro	Leu	Tyr	Ala	Ala	Ile	Phe	Leu	Val
				35						40				45	
Gly	Val	Pro	Gly	Asn	Ala	Met	Val	Ala	Trp	Val	Ala	Gly	Lys	Val	Ala
				50						55				60	
Arg	Arg	Arg	Val	Gly	Ala	Thr	Trp	Leu	Leu	His	Leu	Ala	Val	Ala	Asp
				65						70				75	
Leu	Leu	Cys	Cys	Leu	Ser	Leu	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Pro	Ile	Ala	Arg

85	90	95
Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser		
100	105	110
Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu		
115	120	125
Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr		
130	135	140
Val Gln Arg Ala Cys Gly Val Gln Val Ala Cys Gly Ala Ala Trp Thr		
145	150	155
Leu Ala Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg Leu His		
165	170	175
Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly		
180	185	190
Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly		
195	200	205
Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu		
210	215	220
Cys Trp Ala Ala Arg Arg Cys Arg Pro Leu Gly Thr Ala Ile Val Val		
225	230	235
Gly Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr His Leu Leu Gly Leu Val Leu		
245	250	255
Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala		
260	265	270
Glu Pro Leu Ile Val Gly Leu Ala Leu Ala His Ser Cys Leu Asn Pro		
275	280	285
Met Leu Phe Leu Tyr Phe Gly Arg Ala Gln Leu Arg Arg Ser Leu Pro		
290	295	300
Ala Ala Cys His Trp Ala Leu Arg Glu Ser Gln Gly Gln Asp Glu Ser		
305	310	315
		320

Val Asp Ser Lys Lys Ser Thr Ser His Asp Leu Val Ser Glu Met Glu

325

330

335

Val

【 0 0 9 2 】

<210> 2

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1011)

<400> 2

atg ggg aac gat tct gtc agc tac gag tat ggg gat tac agc gac ctc 48

Met Gly Asn Asp Ser Val Ser Tyr Glu Tyr Gly Asp Tyr Ser Asp Leu

1 5 10 15

tgc gac cgc cct gtg gac tgc ctg gat ggc gcc tgc ctg gcc atc gac 96

Ser Asp Arg Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Ala Cys Leu Ala Ile Asp

20 25 30

ccg ctg cgc gtg gcc ccg ctc cca ctg tat gcc gcc atc ttc ctg gtg 144

Pro Leu Arg Val Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val

35 40 45

ggg gtg ccg ggc aat gcc atg gtg gcc tgg gtg gct ggg aag gtg gcc 192

Gly Val Pro Gly Asn Ala Met Val Ala Trp Val Ala Gly Lys Val Ala

50 55 60

cgc cgg agg gtg ggt gcc acc tgg ttg ctc cac ctg gcc gtg gcg gat 240

Arg Arg Arg Val Gly Ala Thr Trp Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp

65	70	75	80	
ttg ctg tgc tgt ttg tct ctg ccc atc ctg gca gtg ccc att gcc cgt				288
Leu Leu Cys Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ala Val Pro Ile Ala Arg				
85	90	95		
gga ggc cac tgg ccg tat ggt gca gtg ggc tgt cgg gcg ctg ccc tcc				336
Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser				
100	105	110		
atc atc ctg ctg acc atg tat gcc agc gtc ctg ctc ctg gca gct ctc				384
Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu				
115	120	125		
agt gcc gac ctc tgc ttc ctg gct ctc ggg cct gcc tgg tgg tct acg				432
Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr				
130	135	140		
gtt cag cgg gcg tgc ggg gtg cag gtg gcc tgt ggg gca gcc tgg aca				480
Val Gln Arg Ala Cys Gly Val Gln Val Ala Cys Gly Ala Ala Trp Thr				
145	150	155	160	
ctg gcc ttg ctg ctc acc gtg ccc tcc gcc atc tac cgc cgg ctg cac				528
Leu Ala Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg Leu His				
165	170	175		
cag gag cac ttc cca gcc cgg ctg cag tgt gtg gtg gac tac ggc ggc				576
Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly				
180	185	190		
tcc tcc agc acc gag aat gcg gtg act gcc atc cgg ttt ctt ttt ggc				624
Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly				
195	200	205		
ttc ctg ggg ccc ctg gtg gcc gtg gcc agc tgc cac agt gcc ctc ctg				672
Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu				
210	215	220		
tgc tgg gca gcc cga cgc tgc cgg ccg ctg ggc aca gcc att gtg gtg				720

特平 1 0 - 2 4 9 7 5 2

[illegible]

【 0 0 9 3 】

<210> 3

&lt;211&gt; 1287

## <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

cctgtgtgcc acgtgctgga caaatcttaa ctctcaagg actcccaaaa ccagagacac 60
caggagcctg aatggggaac gattctgtca gctacgagta tggggattac agcgacctct 120
cggaccgccc tgtggactgc ctggatggcg cctgcctggc catcgacccg ctgcgcgtgg 180
ccccgctccc actgtatgcc gccatcttcc tgggtgggggt gccgggcaat gccatggtgg 240
cctgggtggc tgggaagggt gcccgccgga ggggtgggtgc cacctggttg ctccacctgg 300
ccgtggcgga tttgctgtgc tgtttgtctc tgcccatcct ggagtgccc attgcccgtg 360
gaggccactg gccgtatggt gcagtgggct gtcgggcgct gccctccatc atcctgctga 420
ccatgtatgc cagcgtcctg ctctggcag ctctcagtgc cgacctctgc ttcctggctc 480
tcgggcctgc ctggtggtct acggttcagc gggcgtgcgg ggtgcaggtg gcctgtgggg 540
cagcctggac actggccttg ctgctcaccg tgccctccgc catctaccgc cggctgcacc 600
aggagcactt ccagcccgg ctgcagtgtg tgggtggacta cggcggctcc tccagcaccg 660
agaatgcggt gactgccatc cggtttcttt ttggcttcct ggggcccctg gtggccgtgg 720
ccagctgcca cagtgcctc ctgtgtggg cagcccgacg ctgccggccg ctgggcacag 780
ccattgtggt ggggtttttt gtctgtggg caccctacca cctgtgggg ctggtgtctc 840
ctgtggcggc ccgaactcc gcactcctgg ccagggccct gcgggctgaa cccctcatcg 900
tgggccttgc cctcgctcac agctgcctca atcccatgct cttcctgtat tttgggaggg 960
ctcaactccg ccggtcactg ccagctgcct gtcactgggc cctgaggag tcccagggcc 1020
aggacgaaag tgtggacagc aagaaatcca ccagccatga cctggtctcg gagatggagg 1080
tgtaggctgg agagacattg tgggtgtgta tcttcttata tcatttcaca agactggctt 1140
caggcatagc tggatccagg agctcaatga tgtcttcatt ttattccttc cttcattcaa 1200
cagatatcca tcatgcactt gctatgtgca aggccttttt aggcactaga gatatagcag 1260
tgaccaaacc agacacaaat cctgccc 1287

```

<210> 4

<211> 1287

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 4

```

gggcaggatt tgtgtctgtt ttggtcactg ctatatctct agtgcctaaa aaggccttgc 60
acatagcaag tgcattgatg atatctgttg aatgaaggaa ggaataaaat gaagacatca 120
ttgagctcct ggatccagct atgcctgaag ccagtccttgt gaaatgagat aagaagatac 180
acaccacaaa tgtctctcca gcctacacct ccattctccga gaccagggtca tggctgggtg 240
atttcttgct gtccacactt tcgtcctggc cctgggactc cctcagggcc cagtgcacagg 300
cagctggcag tgaccggcgg agttgagccc tcccaaaata caggaagagc atgggattga 360
ggcagctgtg agcaggggca aggccacga tgaggggttc agcccgagg gccctggcca 420
ggagtgcgga gttcggggcc gccacagtga gcaccagccc cagcagggtg tagggtgccc 480
agcagacaaa aaacccacc acaatggctg tgcccagcgg ccggcagcgt cgggctgccc 540
agcacaggag ggcactgttg cagctggcca cggccaccag gggccccagg aagccaaaaa 600
gaaaccggat ggcactcacc gcattctcgg tgctggagga gccgccgtag tccaccacac 660
actgcagccg ggctgggaag tgctcctggt gcagccggcg gtagatggcg gagggcacgg 720
tgagcagcaa ggccagtgtc caggctgccc cacaggccac ctgcaccccg cagccccgt 780
gaaccgtaga ccaccaggca ggcccagag ccaggaagca gaggtcggca ctgagagctg 840
ccaggagcag gacgctggca tacatggtca gcaggatgat ggagggcagc gcccgcacagc 900
ccactgcacc atacggccag tggcctccac gggcaatggg cactgccagg atgggcagag 960
acaaacagca cagcaaatcc gccacggcca ggtggagcaa ccagggtgca cccaccctcc 1020
ggcggggccac ctccccagcc acccaggcca ccatggcatt gcccggcacc cccaccagga 1080
agatggcggc atacagtggg agcggggcca cgcgcagcgg gtcgatggcc aggcaggcgc 1140
catccaggca gtccacaggg cggtcgaga ggtcgtgtga atccccatac tcgtagctga 1200
cagaatcgtt cccattcag gtcctggtg tctctggtt tgggagtcct tgaggagtta 1260
agatttgtcc agcacgtggc acacagg 1287

```

【 0 0 9 4 】

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 18、22、24 残基めの n はイノシン/i を示す。

メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の 7 回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした degenerative PCR 法のためのプライマー。

<400> 5

atcttaagct tgaacctngc cntngcdgac 30

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 22、28 残基めの n はイノシン/i を示す。

21 残基めの n は A または G または C または T を示す。

メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の 7 回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした degenerative PCR 法のためのプライマー。

<400> 6

cccaacgaat tcrtagatsa nnggrttnav rca 33

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C5L2の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマー。配列表配列番号2の塩基配列の1番目のAから22番目のTの22塩基配列の5'末端に塩基GGGGおよび制限酵素HindIIIの酵素配列AAGCTTを加えたもの。

<400> 7

ggggaagctt atggggaacg attctgtcag ct 32

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C5L2の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマー。配列表配列番号4の塩基配列の206番目のCから225番目のAの20塩基配列の5'末端にスペーサー配列GGGAと制限酵素SacIIの酵素配列CCGCCGGを加えたもの。

<400> 8

gggaccgcgg cacctccatc tccgagacca 30

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な 7 回膜貫通型受容体蛋白質、またその蛋白質をコードする cDNA、その蛋白質の発現系、さらにその蛋白質の抗体を提供する。

【解決手段】 ヒト未成熟樹状細胞から、本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の cDNA 断片を取得した。その cDNA コード領域全長を取得し、そのコードする新規蛋白質の発現系を作成して、その蛋白質の抗体を作成した。

【効果】 本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 は、樹状細胞の機能を制御する医薬品を探索することに使用が可能である。

【選択図】 選択図なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000000033

【住所又は居所】

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

【氏名又は名称】

旭化成工業株式会社

【書類名】 手続補足書

【整理番号】 X10-00844

【提出日】 平成10年 9月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第249752号

【補足をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 000000033

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代表者】 山本 一元

【補足対象書類名】 特許願

【補足の内容】 受託番号を証明する書面

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証 1

審式 7



19816900234



受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 1153号

通知年月日: 平成 10 年 9 月 1 日

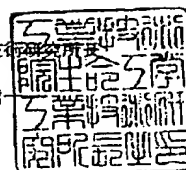
旭化成工業株式会社  
代表取締役

山本 一元

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大 答 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示)  E. coli : DH5-pcDNAC5L2	(受託番号)  FERM P- 16976
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 標の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  ■ 科学的性質  ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 10 年 9 月 1 日に受領した 1 標の微生物を受託する。	

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 手続補足書

< 認定情報・付加情報 >

【補足をする者】 申請人  
【識別番号】 000000033  
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 受託証 1



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日 1990年 8月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏 名 旭化成工業株式会社



-----